论著

文章编号:1000-5404(2008)23-2226-03

融合型自杀基因 Fcy::Fur/5-FC 对人卵巢癌细胞杀伤作用的研究

伍 霞,钟 玲,池余刚,蒋兴伟,王 勇 (重庆医科大学附属第二医院妇产科,重庆 400010)

摘 要:目的 研究融合型自杀基因 Fcy::Fur 联合5-氟胞嘧啶(5-FC)对人卵巢癌细胞株(SKOV3)的杀伤作用。**方法** 构建含有融合型自杀基因 Fcy::Fur 的荧光真核表达质粒,转染 SKOV3 细胞,筛选稳定表达的细胞株,RT-PCR 和 Western blot 检测 Fcy::Fur 表达。以 MTT 法和 FCM 法检测 5-FC 对 Fcy::Fur 转基因细胞的杀伤效应。**结果** 测序鉴定证实插入片段正确。细胞转染 24 h 后,60% 转染细胞发出绿色荧光。经 G418 筛选,RT-PCR 和 Western blot 法检测到 Fcy::Fur 表达。加入 5-FC 后,MTT 法检测到明显杀伤效应,FCM 法检测到显著凋亡峰。**结论** 融合型自杀基因 Fcy::Fur 联合5-FC 对人卵巢癌细胞 SKOV3 有明显的杀伤作用。

关键词:自杀基因;Fcy::Fur;基因转染;稳定表达;SKOV3

中图法分类号:R394-33;R73-362;R737.31 **文献标识码**:A

Killing effects of Fcy::Fur/5-FC transfection on human ovarian cancer cells *in vitro*

WU Xia, ZHONG Ling, CHI Yu-gang, JIANG Xing-wei, WANG Yong (Department of Obstetrics and Gynecology, Second Affiliate Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

Abstract: Objective To investigate the killing effects of Fcy::Fur suicide gene therapy system on human ovarian cancer cells (SKOV3). Methods The EGFP(enhanced green fluorescent protein)-labeled eukaryotic expression plasmid encoding Fcy::Fur suicide gene fragment was constructed. The vector was transferred into SKOV3 cells. The stable transfectants were screened and analyzed by RT-PCR and Western blot analysis for the target gene expression. The killing efficacy of 5-FC on the transfected cells was determined by MTT assays and flow cytometry. Results Correct construction of pEGFP-N1-Fcy::Fur was identified by nucleotide sequencing. About 60% transfected cells displayed green fluorescence after 24 hours' transfection. RT-PCR and Western blotting indicated that the transfected cells expressed Fcy::Fur gene. MTT and flow cytometry showed 5-FC killed transfected SKOV3 cells. Conclusion Fusion suicide gene therapy system Fcy::Fur/5-FC has a significant efficacy to kill human ovarian cancer cell line SKOV3.

Key words: suicide gene; Fcy::Fur; gene transfection; stable expression; SKOV3

卵巢癌死亡率居女性生殖系统恶性肿瘤之首,常规的手术、放疗及化学疗法均难以明显提高患者的远期生存率,尤其是晚期患者的生存率,寻找新的治疗方法迫在眉睫。近年来肿瘤的自杀基因治疗研究已取得显著进展。胞嘧啶脱氨酶(cytosine deaminase,CD)基因/5-氟胞嘧啶(5-FC)系统是目前研究最多的自杀基因系统。融合型自杀基因 Fcy::Fur 融合了酵母菌 CD(yCD)[1]和尿嘧啶磷酸核糖转移酶(uracil phosphoribosyltransferase, UPRT)基因。增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein,EGFP)能在异源组织中表达并产生荧光,已作为报告基因广泛运用于生物学研究领域。本研究采用融合型自杀基因 Fcy::Fur 修饰人卵巢癌 SKOV3细胞,观察 5-FC 对该细胞的杀伤效应,为卵巢癌的治疗提供新方向。

1 材料与方法

1.1 材料

质粒 pORF5-Fcy::Fur 购自 Invivogen 公司,脂质体转染剂 Lipofectin 购自上海 Invitrogen 公司,G418、DNA 标准购自天根生化科技有限公司,限制性内切酶 *Hind*Ⅲ、*Bgl*Ⅱ、T_4 DNA 连接酶和 RT-PCR 试剂盒购自大连宝生物公司,总 RNA 提取试剂盒、小量质粒提取试剂盒和琼脂糖凝胶回收试剂盒购自上海华舜生物工程有限公司,兔抗 GFP 单克隆抗体和兔抗人 tublin 单克隆抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司,PCR 引物由上海生物工程有限公司合成。pEGFP-N1 质粒和人卵巢癌 SKOV3 细胞株、噻唑蓝(MTT)、碘化丙啶(PI)由重庆医科大学基础研究所提供。

作者简介:伍 霞,女,重庆市人,硕士研究生,主要从事卵巢癌基因治疗方面的研究。E-mail:umiko1983@163.com

通信作者:钟 玲,电话:(023)63693502

收稿日期:2008-01-24;修回日期:2008-06-05

1.2　方法

1.2.1　pEGFP-N1-Fcy::Fur 重组质粒的构建与鉴定　　根据 Fcy::Fur 融合基因和质粒 pEGFP-N1 上的多克隆酶切位点,利用 Primer 5.0 设计 1 对引物,2 条引物 5′端分别添加了 *Hind*Ⅲ和 *Bgl*Ⅱ酶切位点,预计扩增长度为 1.1 kb,上游引物:5′-GAAGATCTATGGTCACAGGAGGCAT-3′,下游引物:5′-CCCAA-GCTTGACACAGTAGTATCTGTC-3′。对 pORF5-Fcy::Fur 质粒上的 Fcy::Fur 基因片段进行 PCR 扩增,PCR 产物和载体 pEGFP-N1 均经 *Hind*Ⅲ和 *Bgl*Ⅱ双酶切后回收,用 T_4 DNA 连接酶连接上述 2 个酶切产物,将连接产物转化到大肠杆菌 Top10 感受态细胞中[2],卡那抗性筛选重组质粒 pEGFP-N1-Fcy::Fur。菌液送至重庆医科大学感染病研究实验室测序分析。

1.2.2　重组质粒转染 SKOV3 细胞及 Fcy::Fur 稳定表达细胞株的筛选　　在24 孔板中接种 SKOV3 细胞,37 ℃、5% CO_2 的培养箱中培养 24 h,分别转染重组质粒 pEGFP-N1-Fcy::Fur 和空质粒 pEGFP-N1,并设阴性对照(仅有培养基,不加质粒 DNA)。具体操作按脂质体 Lipofectin 说明书进行。转染 24 h 后,488 nm 紫外激发光下观察细胞绿色荧光蛋白产生情况,计算转染率。96 h 后,改用选择性培养基,G418 浓度为 300 mg/L;18 d 后,挑取单克隆细胞扩大培养,建立稳定传代的转染细胞株 SKOV3-Fcy::Fur 和 SKOV3-pEGFP。

1.2.3　RT-PCR 和 Western blot 检测稳定表达细胞株中 Fcy::Fur表达　　对 SKOV3-Fcy::Fur 细胞进行 RT-PCR 分析,SKOV3-pEGFP 和 SKOV3 细胞作对照。收集上述 3 种细胞的总蛋白,Western blot 检测 Fcy::Fur 表达情况。

1.2.4　MTT 法检测细胞生长抑制情况　　将 SKOV3-Fcy::Fur、SKOV3-pEGFP 和 SKOV3 细胞分别接种于96 孔板,孵育24 h后加入 5-FC,浓度分别为:0.1、1.0、10.0、100.0、1 000.0、10 000.0 μmol/L,每种浓度设 3 个复孔。培养 5 d 后,每孔加入 MTT 溶液孵育 4 h,弃上清加入 DMSO,振荡 10 min,酶标仪 490 nm 处测定各孔吸光度值[$D(490)$]。设不加药物孔为对照。

细胞生长抑制率(%) = [$D(490)_{对照孔} - D(490)_{实验孔}$]/$D(490)_{对照孔} \times 100\%$

1.2.5　流式细胞仪检测细胞凋亡情况　　在 SKOV3-Fcy::Fur 细胞中加入终浓度为100 μmol/L 的 5-FC,培养 96 h 后,收集 1×10^6 个细胞,PBS 洗涤后,70% 乙醇固定,流式细胞仪检测细胞凋亡情况。并设 SKOV3 -pEGFP 和 SKOV3 细胞为对照。

1.3　统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计软件,计量资料的比较采用单因素方差分析及 q 检验,计数资料比较采用 χ^2 检验。

2　结果

2.1　pEGFP-N1-Fcy::Fur 重组质粒的鉴定

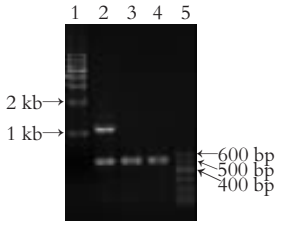
自杀基因 Fcy::Fur 扩增后与载体 pEGFP-N1连接并筛选,获得的重组质粒 pEGFP-N1- Fcy::Fur 经测序,证实 2 个连接点处序列正确,无移码改变,且通过目的基因全长双向测序,证实目的基因与 Invivogen 公司提供的原序列完全一致。

2.2　重组质粒转染 SKOV3 细胞及 Fcy::Fur 稳定表达细胞株的筛选

重组质粒转染 SKOV3细胞,24 h 后在荧光显微镜下观察,见特异性的绿色荧光。分别记录每个转染细胞培养孔四周和中央 5 个视野内明视野和暗视野所观察到的细胞数,按转染率(%) = 暗视野所见发强绿色荧光的细胞数/明视野所见细胞总数 × 100%,计算转染率为 60%。经 G418 筛选 18 d 后,转染重组质粒及空质粒组均出现抗性克隆,未转染组在加入 G418 后 14 d,全部死亡。

2.3　RT-PCR 法检测稳定表达细胞株中 Fcy::Fur 表达

SKOV3-Fcy::Fur 细胞的 RT-PCR 产物电泳见约1.1 kb(目的片段)和 512 bp 条带(内参)。而 SKOV3-pEGFP 和 SKOV3 细胞产物电泳仅见约 512 bp 的条带(内参),未见目的条带(图 1)。

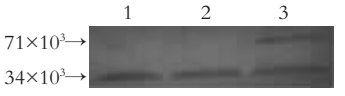


1:标准(1 kb DNA 标准);2:稳定转染 SKOV3-Fcy::Fur 细胞;3:SKOV3-pEGFP 细胞;4:SKOV3 细胞;5:标准 I

图 1　稳定表达细胞系的 RT-PCR 电泳图

2.4　Western blot 检测稳定表达细胞株中 Fcy::Fur 表达

在线软件预测重组质粒融合蛋白相对分子质量约为71×10^3。Western blot 经 DAB 显色(图 2),重组质粒转染组在 71×10^3左右见一特异性条带,空质粒转染组和未转染组在 71×10^3 均未见条带,三者在 34×10^3 位置均见内参条带。说明 Fcy::Fur 基因与 EGFP 基因融合并在真核细胞中稳定表达蛋白。



1:SKOV3 细胞;2:SKOV3-pEGFP 细胞;3:SKOV3-Fcy::Fur 细胞

图 2　稳定表达细胞株中 Fcy::Fur 表达的 Western blot 检测结果

2.5　MTT 法检测细胞生长抑制情况

分别测出 5-FC 终浓度为 0.1、1.0、10.0、100.0、1 000.0、10 000.0 μmol/L 培养 5 d 后,SKOV3- Fcy::Fur、SKOV3-pEGFP 和 SKOV3 细胞的吸光度值,按公式计算细胞生长抑制率,绘制细胞生长抑制曲线(图 3)。

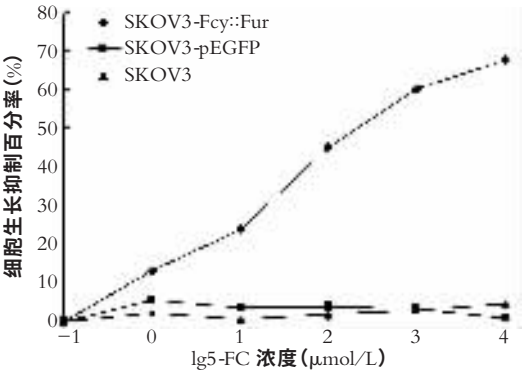


图 3　细胞生长抑制曲线

2.6 流式细胞仪检测细胞凋亡情况

SKOV3-Fcy::Fur 细胞在加入5-FC 后 96 h 经流式细胞仪检测在正常二倍体细胞 G_0/G_1 峰前出现一个明显的亚二倍体峰，即 AP 峰(apoptotic peak)，此峰代表凋亡细胞，根据此峰计算出 SKOV3-Fcy::Fur 细胞中凋亡细胞所占百分率为18.16%。而 SKOV3-pEGFP 和 SKOV3 细胞经 5-FC 作用后其凋亡细胞所占百分率分别为 2.38% 和 0.09%，3 种细胞间比较，差异有统计学意义($P<0.05$)。

3 讨论

在肿瘤的基因治疗研究中，自杀基因治疗已经显示出显著的优越性和临床应用前景。SKOV3 卵巢癌细胞系来源于人卵巢浆液性乳头状腺癌，具有侵袭性强、转移率高、预后差的特点[3]，目前急待探寻新的治疗方法。自杀基因治疗有望为卵巢癌的治疗提供新思路。CD/5-氟胞嘧啶(5-FC)系统是目前研究最多的自杀基因系统。研究表明，CD/5-FC 通过诱发凋亡，改变蛋白质组，活化热休克蛋白 90β(heat shock protein 90β, Hsp90β)等机制促进肿瘤消退，提高肿瘤免疫原性，为肿瘤的预防治疗提供了新方向[4]。

融合型基因 Fcy::Fur 由功能密切相关的 CD 基因和 UPRT 基因融合而成。它具有比传统 CD 基因更大的优势。首先，Fcy::Fur 中 CD 基因来自酵母菌。yCD 比 bCD 具有更高的酶活性，其使 5-FC 转化为 5-FU 的 Km 值仅为 bCD 的 1/22，而最大转化率是 bCD 的 3.5~6.0 倍[1]。实验已证实 yCD 的抗肿瘤作用明显高于 bCD。此外，5-FU 发挥抗肿瘤作用要依靠其代谢活性产物：三磷酸氟尿嘧啶(FUTP)和 5-氟脱氧尿嘧啶核苷酸(FdUMP)。前者结合到 RNA 上，干扰 RNA 功能，后者通过抑制胸苷酸合成酶而阻止 DNA 的合成，是抗肿瘤的主要机制。Fcy::Fur 中 UPRT 基因编码的 UPRT 可将5-FU 直接转化为 FdUMP 而发挥抗肿瘤作用。联合应用 yCD-UPRT 能显著提高肿瘤细胞对 5-FC 的敏感性[5]。

基因治疗的关键是如何高效地将外源基因导入靶细胞内并使其稳定表达。因此，选择载体至关重要。本实验采用 pEGFP-N1 真核荧光表达载体，与其他真核表达载体相比，优势在于其 3′端连接有 EGFP 基因。EGFP 基因容易与目的基因融合，对目的基因的结构功能没有影响[6]。EGFP 在紫外光激发下形成鲜明的绿色荧光，通过荧光显微镜即可直接观察，从而间接反映与其相融合的目的基因的表达情况[7]，能简单直观地计算出转染效率，便于筛选稳定表达目的基因的细胞株。此外，EGFP 对宿主细胞无毒性[8]，其荧光表达稳定，几乎不受种属限制，也没有细胞种类和位置的限制，便于在活体内观察，是理想的长期表达示踪剂[9]。

本研究构建了含有融合型自杀基因 Fcy::Fur 的荧光真核表达质粒，并转染高转移性卵巢癌细胞 SKOV3 后，获得稳定表达 Fcy::Fur 的阳性细胞。加入 5-FC后，显示出明显的肿瘤细胞生长抑制作用，且随 5-FC浓度增加，抑瘤作用显著增强。SKOV3-Fcy::Fur 细胞经5-FC 作用后，出现明显的凋亡峰，提示 5-FC 杀伤 SKOV3-Fcy::Fur 细胞可能有凋亡机制参与，为进一步研究自杀基因 Fcy::Fur 的作用机制提供了方向。本研究已在细胞水平证明了融合型自杀基因 Fcy::Fur 联合5-FC 能显著杀伤人卵巢浆液性乳头状腺癌 SKOV3 细胞，为进一步研究该系统的体内抑瘤效果提供了重要的实验基础和理论依据。

参考文献：

[1] Hiraoka K, Kimura T, Logg C R, *et al*. Therapeutic efficacy of replication-competent retrovirus vector-mediated suicide gene therapy in a multifocal colorectal cancer metastasis model [J]. Cancer Res, 2007, 67(11): 5345-5353.

[2] 萨姆布鲁克 J，拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南[M]. 第 4 版. 黄培堂，俞炜源，陈添弥，译. 北京：科学出版杜，2005：26.

[3] 李 昱，米 粲. genistein 抑制人卵巢浆液性乳头状囊腺癌细胞系 $SKOV_3$ 体外侵袭作用的分子机制[J]. 第三军医大学学报，2007，29(16)：1601-1604.

[4] Negroni L, Samson M, Guigonis J M, *et al*. Treatment of colon cancer cells using the cytosine deaminase/5-fluorocytosine suicide system induces apoptosis, modulation of the proteome, and Hsp90beta phosphorylation[J]. Mol Cancer Ther, 2007, 6(10): 2747-2756.

[5] Fogar P, Navaglia F, Basso D, *et al*. Suicide gene therapy with the yeast fusion gene cytosine deaminase/uracil phosphoribosyltransferase is not enough for pancreatic cancer[J]. Pancreas, 2007, 35(3): 224-231.

[6] Tao W, Evans B G, Yao J, *et al*. Enhanced green fluorescent protein is a nearly ideal long-term expression tracer for hematopoietic stem cells, whereas DsRed-express fluorescent protein is not[J]. Stem Cells, 2007, 25(3): 670-678.

[7] Ueta Y, Fujihara H, Serino R, *et al*. Transgenic expression of enhanced green fluorescent protein enables direct visualization for physiological studies of vasopressin neurons and isolated nerve terminals of the rat [J]. Endocrinology, 2005, 146(1): 406-413.

[8] Vitriol E A, Uetrecht A C, Shen F, *et al*. Enhanced EGFP-chromophore-assisted laser inactivation using deficient cells rescued with functional EGFP-fusion proteins[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(16): 6702-6707.

[9] Tamberg N, Lulla V, Fragkoudis R, *et al*. Insertion of EGFP into the replicase gene of Semliki Forest virus results in a novel, genetically stable marker virus[J]. J Gen Virol, 2007, 88(Pt 4): 1225-1230.

（编辑 汪勤俭）